

20111101JB

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする
診断-治療機能一体型DDSの創製

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 西山 伸宏

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする
診断-治療機能一体型DDSの創製

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 西山 伸宏

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

固形がんの標的治療とその治療効果の MRI による追跡を可能にする診断・治療機能一体型

DDS の創製 (西山 伸宏) 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 14

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（総合）研究報告書

固形がんの標的治療とその治療効果のMRIによる追跡を可能にする
診断-治療機能一体型DDSの創製

研究代表者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 准教授

研究要旨

がん組織に選択的に集積し、がんのMRI診断に広く利用できるMRI造影剤が望まれているが、そのような造影剤は未だ開発されていないのが現状である。また、がん化学療法においては、その有効性を的確に把握する必要がある、その目的においてMRIは有効な手段であると考えられる。そこで本研究では、第一に、現在、第一相臨床治験中のDachPt内包高分子ミセルに、MRI造影剤のGd-DTPAを搭載し、DachPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-治療機能一体型DDSを開発した。本システムに関しては、膵臓がん同所移植モデルマウスを用いた動物実験により、DachPtによる抗腫瘍効果をMRイメージングで追跡することに成功し、Theranostic Nanomedicineの概念を実証することができた。一方、がんの精密診断のためには、制がん活性を持たないGd-DTPA内包高分子ミセルが有用であると考えられる。そこで本研究では、新たな分子設計に基づき、Ptをリンカーとして可逆的な配位結合によりGd-DTPAをポリマーに結合した高分子ミセルを開発した。動物実験の結果、本システムは、Gd-DTPAのがん集積性を高める一方で、ミセルからGd-DTPAをリリースすることによって蓄積毒性を示さないシステムとして機能することが明らかになった。

A. 研究目的

がん組織に選択的に集積し、がんのMRI診断に広く利用できるMRI造影剤が望まれているが、そのような造影剤は未だ開発されていないのが現状である。また、がん化学療法においては、その有効性を的確に把握する必要がある、その目的においてMRIは有効な手段であると考えられる。近年、Gdのデリバリーの為のDDSが活発に開発されているが、固形がんの選択的造影に成功した例は数少なく、すべてのシステムにおいてGdがDDS担体に安定な共有結合で導入されている為、Gdの蓄積毒性が問題となる。そこで本研究では、Gd-DTPAと白金の可逆的な錯体形成を利用してGd-DTPAを内包した高分子ミセルを開発している。このようなシステムは、Gd-DTPAがDDS担体から最終的には放出され、体外に排泄されるために、安全性面において極めて優れていると考えられる。

本研究では、第一に、研究代表者である西山が過去に開発を行い、現在、第一相臨床治験中のオキサリプラチン活性体(DachPt)を内包する高分子ミセルに、Ptとカルボキシル基が可逆的な金属錯体を形成することを利用してMRI造影剤のGd-DTPA

を搭載した系を開発した(図1)。本システムに関しては、DachPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-治療機能一体型DDS(Theranostic Nanodevice)としての機能を検証した。

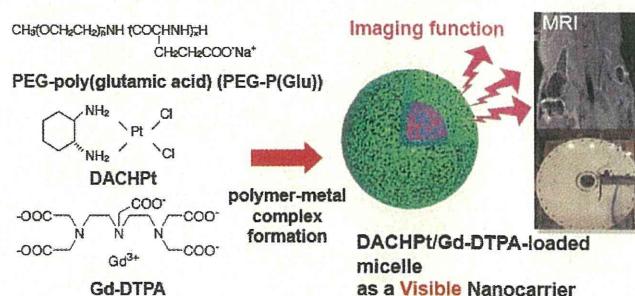


図1. 診断-治療機能一体型DDSとしてのDachPt/Gd-DTPA内包ミセル

一方、上記のシステムは投与量に関して、制がん剤の最大耐用量に基づく制限があり、鮮明な固形がんイメージングを目的として投与量を上げる必要があるために、研究期間の後半において、制がん活性を持たないGd-DTPA内包ミセルを開発した。具体的には、制がん活性を持たないヘキサクロロ白金酸(H_2PtCl_6)と生分解性を有することにより蓄積毒性を示さないPEG-PAsp(DET)の金属錯体形成により高分

子ミセルを形成させ、Ptの可逆的な金属錯体形成を介してGd-DTPAを内包させた系を開発した(図2)。

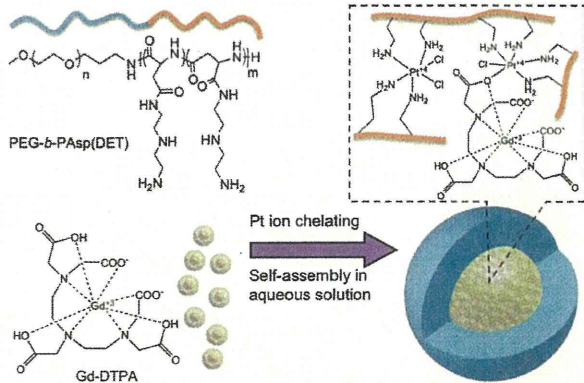


図2. 白金の金属錯体形成を利用してGd-DTPAを内包した高分子ミセル

B. 研究方法

1. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製

5mMのDACHPt ジニトрат錯体と5mMのGd-DTPAを混合し、24時間培養した後、poly(ethylene glycol)-*b*-poly(glutamic acid) (PEG-*b*-P(Glu))ブロック共重合体(組成: PEG=12,000; P(Glu)重合度20)を[DACHPt]/[Glu]比が1になるように加え、120時間反応させた。その後、透析を行い、限外ろ過による精製を行った。DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルの形成の有無は、動的光散乱(DLS)測定によって確認を行い、DACHPtおよびGd-DTPAの内包量はICP-MSにより定量した。また、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの安定性に関しては、150mM NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH7.4)中におけるミセルからのDACHPtおよびGd-DTPAの放出とミセルの散乱光強度の変化を測定した。さらに、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルのT1緩和能をパルスNMRを用いたファントム実験により評価した。

2. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価

マウス大腸がんC-26細胞を皮下に移植したBalb/cマウス(♀, 6週齢)に対して、オキサリプラチン、Gd-DTPA、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、1、4、8、24時間後の血液中およびがん組織中のPtおよびGd量を組織の硝酸加熱後、ICP-MS測定を行うことにより定量した。

3. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの制がん活性評価

C-26皮下移植マウスに対して、1日おきに3回、オキサリプラチン(3mg/kg)およびDachPt/Gd-DTPA内包ミセル(8mg/kg)を投与し、経時的に腫瘍体積を測定することによって制がん活性を評価した。また、毒性を評価するために、マウスの体重変化の測定を同時に行った。

4. 膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング ヒト膵臓がんBxPC3細胞をBALB/cヌードマウス

(♀, 6週齢)の膵臓の皮膜下に直接注入することによって膵臓がん同所移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、5 μ mol/kgのGd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、4.7-T UNITY INOVA imaging spectrometer (Varian, Inc.)によってマウスの腹腔部のMRイメージングを行った。MRイメージングに関しては、ファントムをリファレンスとして投与から10分毎に4時間までの画像を取得した。

5. がん組織におけるGdおよびPtの集積性の評価

上述の膵臓がん同所移植モデルに対してPt換算で3mg/kgのDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、4時間後の凍結切片のSpring-8を用いた蛍光X線分析(μ -SR-XRF)を行った。

6. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いた膵臓がん同所移植モデルに対する制がん活性のMRIによる追跡

上述の膵臓がん同所移植モデルに対して、Pt換算で8mg/kg、Gd換算で3mg/kgのDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、投与2時間後のMRIを7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)によって撮像した。コントロールとしては、30mg/kgのGd-DTPAを投与し、投与30分後にMRI撮像を行った。薬剤の投与とMRI撮像は、0, 4, 8, 11, 18日目に行い、計算式に基づいて算出した腫瘍の体積をMRIによって追跡した。18日目にマウスを犠牲死させ、摘出した膵臓がんの大きさを目視により確認した。

7. Gd-DTPA内包ミセルの調製

Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*N*-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl aspartamide) (PEG-*b*-P(Asp(DET))) (P(Asp(DET))の重合度: 45)とH₂PtCl₆、Gd-DTPAを水中で混合し、120時間反応させることによって、Gd-DTPA内包ミセルを調製した。ここで、[Gd-DTPA]/[DET] = 1.0として、Pt:Gd比を変化させてミセル調製を行い、DLS測定によってミセル形成の有無を確認した。また、ICP-MSを利用してPtおよびGd-DTPAの導入率を算出し、ミセル形成のための最適条件を検討した。

また上記の検討により最適条件において形成されたGd-DTPAおよびGd-DTPA内包ミセルに関して、T1緩和能をパルスNMR(JNM-MU25A, JEOL)を用いたファントム実験により測定した。

8. Gd-DTPA内包ミセルの安定性評価

生理的条件下(150mM NaCl, pH7.4, 37°C)におけるGd-DTPA内包ミセルの安定性とPtおよびGdのリリースを評価した。ここで、ミセルの安定性は、DLSによって、散乱光強度と粒径の変化を測定することによって評価し、ミセルからのPtおよびGdのリー

ス、ミセル溶液を透析した後の外液中のPtおよびGdの量をICP-MSで定量することによって評価した。

9. Gd-DTPA内包ミセルの細胞毒性評価

Gd-DTPA内包ミセルならびにそれらの構成成分と正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を培地中で72時間培養し、細胞生存率をCCK-8 assayによって評価した。

10. Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価と固形がんモデルのMRイメージング

Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価: マウス大腸がんC26細胞をBALB/cマウス(♀, 6週齢)の皮下に直接注入することによって固形がんモデルマウスを作製した。このマウスに対して、Gd-DTPAおよびDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルをi.v. 投与し(Gd換算で78 μg/mouse)、一定時間経過後に血漿と主要臓器ならびに固形がんを摘出した。その後、得られた生体組織を90% HNO₃中で加熱することによって溶解し、1% HNO₃溶液に調製した後にPt量をICP-MSによって定量した。

蛍光X線によるPt、Gdのがん組織への集積性の評価: 上述の固形がんモデルマウスに対してGd換算で100 μg/mouseのGd-DTPA内包ミセルを投与し、24時間後の凍結切片のSpring-8を用いた蛍光X線分析(μ-SR-XRF)を行った。

固形がんモデルのMRイメージング: 上述の固形がんモデルマウス(腫瘍サイズ100 mm³)に対して、0.02 mmol/kgのGd-DTPAおよびDACHPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与し、1-T MRI (Aspect Imaging)によってマウスの腹腔部のMRイメージングを行った。MRイメージングに関しては、ファントムをリファレンスとして投与から10分毎に4時間までの画像を取得した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

1. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製

DACHPtとGd-DTPAを異なる比率で混合し、PEG-GP(Glu)と反応させることによって、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルの調製条件の最適化を行った。その結果、Gd-DTPAが5mMの条件において、DACHPtとGd-DTPAの両者が最も効率的に内包され、粒径33nmで非常に粒径分布の狭いナノ粒子の形成が確認された。ミセルに内包されたGd-DTPA量は、モル比でDACHPtの1/5であった。また、150mM NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH7.4)中におけるミセルからのDACHPtおよびGd-DTPAの放出を評価したところ、DACHPtとGd-DTPAは共にミセルから徐放されることが明らかとなり、24時間後におけるDACHPtおよびGd-DTPAのリリース量はそれぞれ10%および50%であった。さらに、パルスNMRを用いたファントム実験により、DACHPt/Gd-

DTPA内包ミセルは、Gd-DTPAの24倍のT1緩和能を有することが明らかとなった。

2. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価

DachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後の血中のPtおよびGdの濃度を図3に示す。本結果では、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、オキサリプラチンおよびGd-DTPAと比較してそれぞれ血中のPt濃度およびGd濃度を飛躍的に高めることが明らかになった。次に、がん組織(C-26)におけるPtおよびGdの集積量を図4に示す。本結果においてもDachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、オキサリプラチンおよびGd-DTPAと比較して顕著に高いがん集積性を示すことが明らかになった。

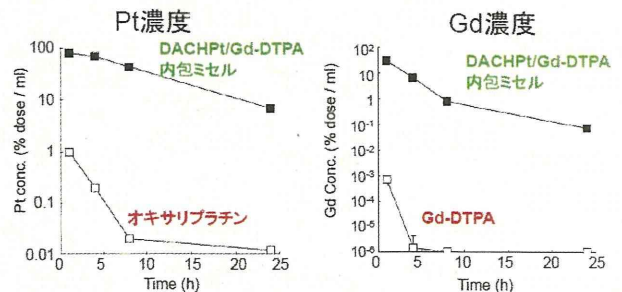


図3. DachPt/Gd-DTPA内包ミセル、オキサリプラチンおよびGd-DTPAの全身投与後のPt(左)およびGd(右)の血中濃度

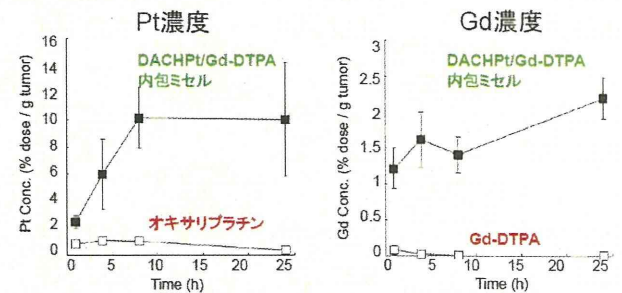


図4. DachPt/Gd-DTPA内包ミセル、オキサリプラチンおよびGd-DTPAのPt(左)およびGd(右)のがん集積性

3. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの制がん活性評価

DachPt/Gd-DTPA内包ミセルのC-26の皮下移植モデルに対する制がん活性を評価した結果を図5に示す。本結果では、オキサリプラチンは有意な制がん活性を示さなかったが、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは顕著に腫瘍の増殖を抑制することが明らかになった。

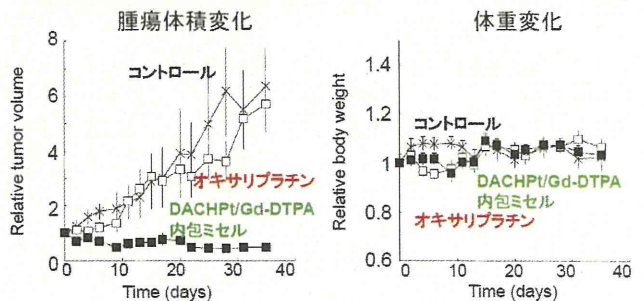


図5. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの制がん活性評価(左:相対腫瘍体積変化; 右:体重変化)

4. 膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング

本研究において用いたヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルと組織切片のH&E染色の結果を図6に示した。この結果より、本モデルは実際の膵臓がんと同様に間質が豊富な腫瘍であることが示唆された。この膵臓がんモデルに対してGd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを投与した後のMRIを図7に示した。また、腫瘍および各臓器における T_1 信号強度の変化を測定した結果を図8に示した。図7, 8より、Gd-DTPAの投与ではMRIシグナルの増大は確認されなかったが、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの投与によって腫瘍特異的に信号強度が増大することが確認された。

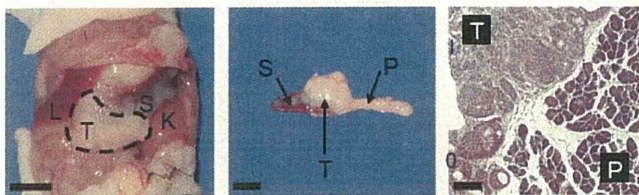


図6. ヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルとがん組織のH&E染色 (T:がん; P:膵臓; S:脾臓; L:肝臓; K:腎臓)

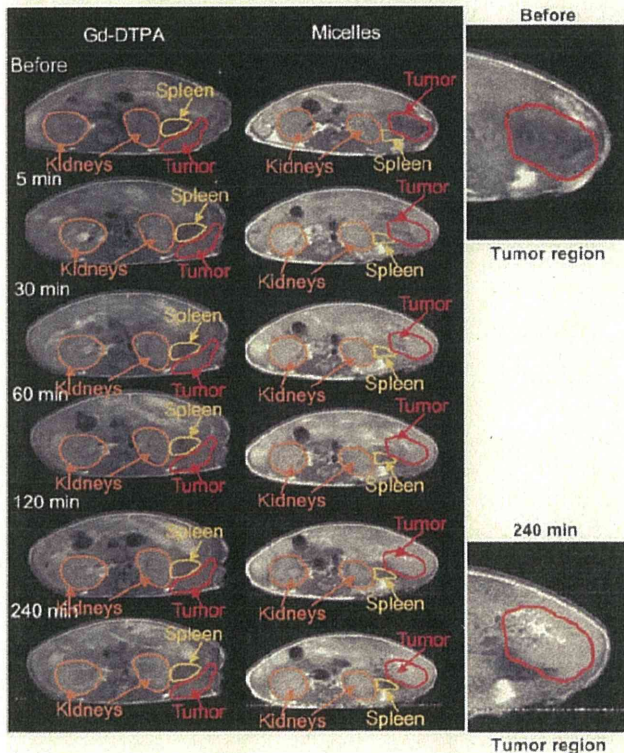


図7. Gd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセルによる膵臓がん同所移植モデルのMRイメージング

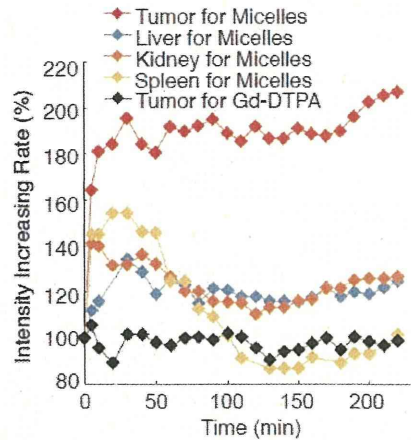


図8. Gd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後の腫瘍および各臓器における T_1 信号強度の変化

5. がん組織におけるGdおよびPtの集積性の評価

膵臓がん同所移植モデルの凍結切片の μ -SR-XRFによって得られたK, Fe, Gd, Ptの元素マッピングの結果を図9に示した。ここで、Kはがん細胞で活性が亢進している pyruvate kinase の co-factorであり、その分布はがん細胞の分布を反映している。Feは、ヘム鉄によるものであり、その分布は血流の分布を反映している。これらを考慮すると、図9では、GdとPtはどちらもがん組織に対して選択的に集積していることが分かる。さらに蛍光標識DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いて凍結切片の蛍光観察を行ったところ、がん組織に選択的に蛍光が確認された (data not shown)。以上の結果より、膵臓がんの同所移植モデルにおいてもDachPt/Gd-DTPA内包ミセルはがん組織に対して選択的に集積することが示唆された。

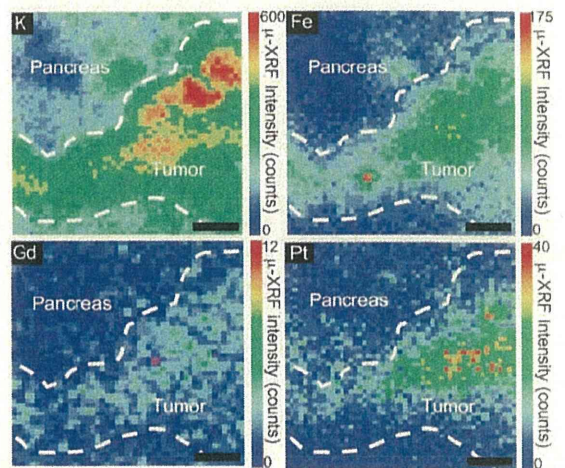


図9. ヒト膵臓がんBxPC3細胞の同所移植モデルとがん組織のH&E染色 (T:がん; P:膵臓; S:脾臓; L:肝臓; K:腎臓)

6. DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いた膵臓がん同所移植モデルに対する制がん活性のMRIによる追跡 Theranostic Nanomedicineの概念を実証するた

めに、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルを用いて膵臓がん同所移植モデルに対して制がん剤(DACHPt)による治療効果をMRIにより追跡した(図10)。

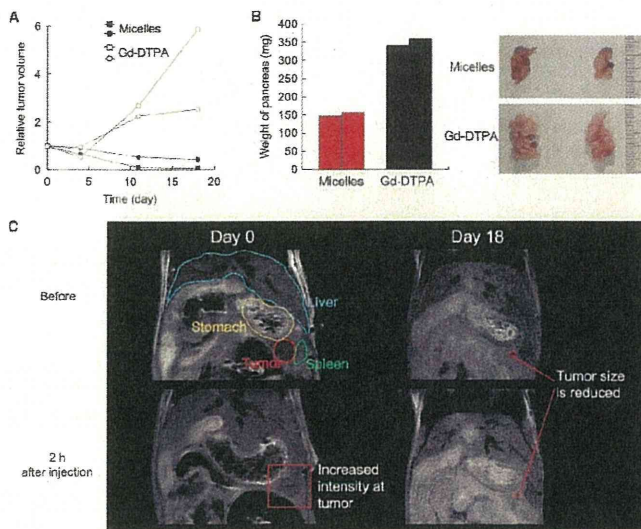


図10. A) DachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後の腫瘍体積の変化; B) 18日後の摘出腫瘍の重量と肉眼像; C) 0日後、18日後のGd-DTPAおよびDachPt/Gd-DTPA内包ミセル投与後のMRI画像

7. (制がん活性を持たない)Gd-DTPA内包ミセルの調製

仕込みにおける[Pt]/[Gd-DTPA]のモル比を変化させてミセルを調製し、形成されたミセルのHydrodynamic diameter と polydispersity index (PDI) をDLSによって評価した。その結果、[Pt]/[Gd-DTPA]比が5および10の時に、粒径が40-50nmでPDIが0.1以下の水中で安定な高分子ミセルが形成された。また、Gdの内包率を検討したところ、[Pt]/[Gd-DTPA]比が5および10の時に、内包率がそれぞれ16%および12%であったことから、以降の実験では[Pt]/[Gd-DTPA]=5の条件でミセル調製を行った。この条件で形成されたミセルは非常に狭い粒径分布を有することが確認された。

このように最適条件において形成されたGd-DTPA内包ミセルに関して、T1緩和能をパルスNMRを用いたファントム実験により測定した。その結果、Gd-DTPA内包ミセルは、Gd-DTPAの13.1倍のT1緩和能を有することが明らかとなった。

8. Gd-DTPA内包ミセルの安定性評価

Gd-DTPA内包ミセルの生理的条件下(150mM NaCl, pH7.4, 37°C)における安定性をDLS測定によって評価した(図11 a, b)。その結果、48時間経過後もミセルの粒径に変化は見られないが、散乱光強度は時間依存的にゆっくりと減少し、初期の60%程度に達することが確認された。さらに、PtおよびGdのリリースを評価したところ、Ptはほとんどリリー

スされないが、Gdは10時間をかけてゆっくりとリリースされ、内包量の80%まで到達することが確認された(図11 c)。これらの結果は、Gd-DTPAを徐放するシステムであることを示唆している。

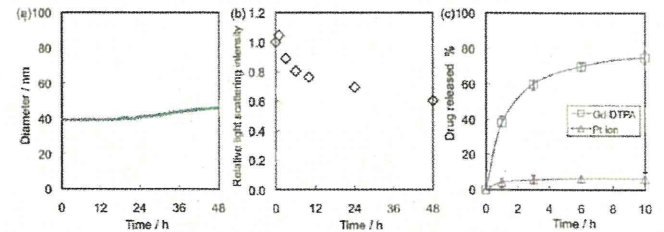


図11. 生理的条件下(150mM NaCl, pH7.4, 37°C)におけるGd-DTPA内包ミセルの安定性評価[(a) 粒径変化、(b) 散乱光強度変化、(c) PtおよびGdのミセルからのリリース]

9. Gd-DTPA内包ミセルの細胞毒性評価

Gd-DTPA内包ミセルならびにそれらの構成成分のHUVECに対する細胞毒性を評価した(図12)。その結果、 H_2PtCl_6 は0.1mg/mLにおいて毒性を示したものの、Gd-DTPA内包ミセルならびにそれらの構成成分はHUVECに対して細胞毒性を示さないことが明らかになった。

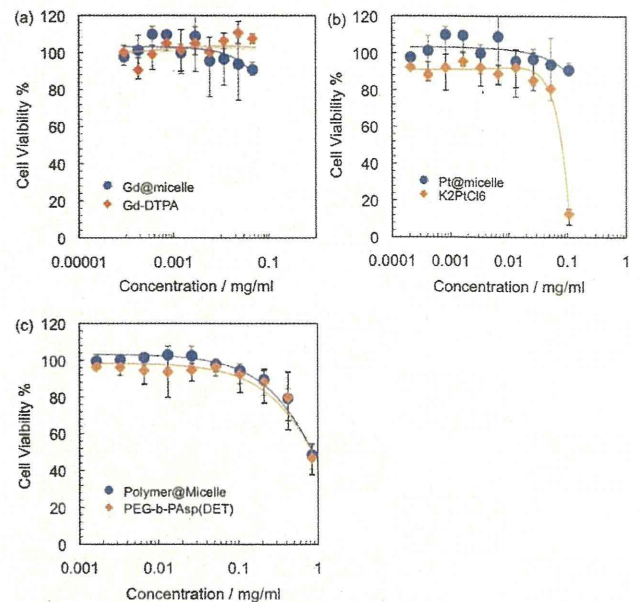


図12. HUVECに対するGd-DTPA内包ミセルおよびそれらの構成成分の細胞毒性評価(72時間培養)

10. Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価と固形がんモデルのMRイメージング

Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価: C26細胞の皮下移植モデルマウスにおけるGdおよびPtの血中滞留性、Gdの固形がんへの集積性、正常臓器とがんのGdの集積比をGd-DTPA内包ミセルとGd-DTPAと比較した(図13 a-d)。その結果、Gd-DTPAと比較してGd-DTPA内包ミセルはGdの血中滞留性と固形がんへの集積を高め、がんへの選択的な集積を実現することが明らかになった。

蛍光X線によるPt、Gdのがん組織への集積性の評価：固形がんの凍結切片の μ -SR-XRFによって得られたFe、Gd、Ptの元素マッピングの結果を図13 eに示した。ここで、Feは、ヘム鉄によるものであり、その分布は血流の分布を反映している。このことを考慮すると、GdとPtはどちらもがん組織に集積し浸透していることが分かる。

固形がんモデルのMRイメージング：1T-MRIによって固形がんのMRイメージングを行った結果を図13 fに示す。この結果、Gd-DTPAの投与ではMRIシグナルの増大は確認されなかったが、Gd-DTPA内包ミセルの投与によって腫瘍特異的に信号強度が増大することが確認された。

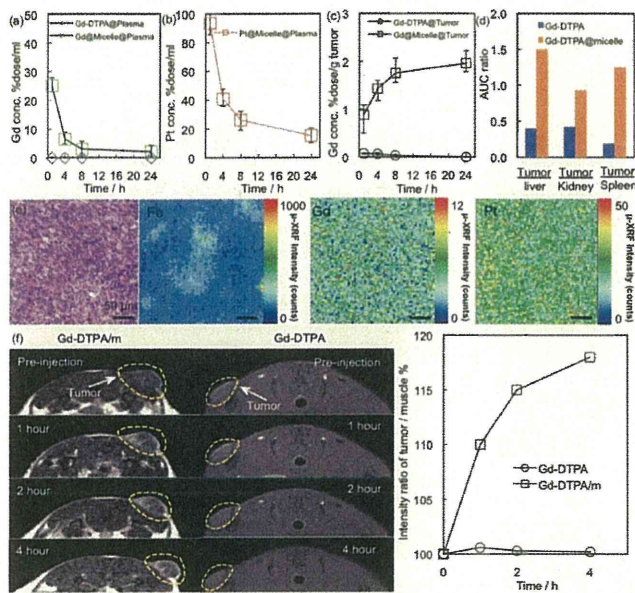


図13. (a-d) C26細胞の皮下移植モデルマウスにおけるGdおよびPtの血中滞留性、Gdの固形がんへの集積性、正常臓器とがんのGdの集積比。(e) μ -SR-XRFによるFe、Gd、Ptの元素マッピング。(f) 固形がんのMRイメージングの結果

D. 考察

本研究では、研究期間の前半において、制がん剤DachPtとMRI造影剤Gd-DTPAを同時に搭載したDachPt/Gd-DTPA内包ミセルを開発した。DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、33nmの粒径を有することが確認され、生理的条件下におけるミセルからのDACHPtおよびGd-DTPAのリリース実験においては、DACHPtとGd-DTPAは共にミセルから徐放され、Gd-DTPAはDACHPtよりも速くリリースすることが確認された。これは、制がん活性を示すDACHPtは、がん組織に滞留する必要がある一方で、Gd-DTPAはMRI撮像後になるべく速やかに体外に排泄されることが望ましいという点からは理想的な特性であると言える。一方で、MRI造影剤としての性能評価では、ミセルはGd-DTPAの24倍のT1緩和能を有することが確認され、MRI造影剤として非常に高い性能を

有することが示唆された。DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの生物学的評価に関しては、膵臓がん同所移植モデルにおけるMRイメージング能を評価した。その結果、Gd-DTPAの投与ではMRIシグナルの増大は確認されなかったが、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルの投与によって腫瘍特異的に信号強度が増大することが確認された(図7, 8)。ここで、腫瘍部位の検知が容易な皮下腫瘍ではなく、他臓器によるMRI信号のために検知が困難な同所移植がんのMRイメージングに成功したことは極めて重要である。特に、膵臓がんは、血管密度が疎らであり、間質が豊富であるために増感剤の集積性が著しく低下しており、早期発見が極めて困難であることが知られている。本実験では、実際の膵臓がんと同様な組織構築を有するBxPC3腫瘍に対して[M. R. Kano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104 (9) 3460-3465 (2007)]、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルが効果的に集積し(図9)、腫瘍のMRイメージングを可能にすることを示すものであり、難治性の膵臓がんの診断・治療に革新をもたらす成果として期待される。一方、本研究では、制がん剤(DACHPt)による治療効果をMRIにより追跡する実験を行った結果、DachPt/Gd-DTPA内包ミセルは、BxPC3の同所移植モデルに対しても有効であり、腫瘍の増殖抑制効果をMRIによって追跡することが可能であることが示された(図10)。以上のように、本研究では、近年大きな注目を集めているTheranostic Nanomedicineの概念を難治性の膵臓がんモデルを用いて実証することができた。この成果は、2010年にCancer Research誌(S. Kaida, H. Cabral, N. Nishiyama et al. Cancer Res. 70 (18) 7031-7041 (2010))に掲載され、関連分野に大きなインパクトを与えるものと考えられる。

一方、本研究では、研究期間の後半において、固形がんの精密診断を目的として、制がん活性を持たないGd-DTPA内包ミセルを開発した。具体的には、Ptをリンカーとして可逆的な配位結合によりGd-DTPAをポリマーに結合した高分子ミセルの開発を行った。ポリマーにDTPAやDOTA等のキレート化剤を共有結合した場合には、Gd-DTPAがリリースされないために長期にわたり体内に滞留することに起因する毒性の高いGd²⁺イオンのリリースや肝臓等へのGdの蓄積毒性が問題となるが、本システムでは生理的条件下において10時間で約80%のGd-DTPAをリリースすることが確認され(図11)、リリースされたGd-DTPAは速やかに腎糸球体よりろ過排泄されるものと考えられることから体内への蓄積毒性を示さないものと考えられる。実際に、本システムの毒性を評価するために、HUVECに対する細胞毒性を評価したところ、Gd-DTPA内包ミセルならびにそれらの構成成分はHUVECに対して細胞毒性を示さないことが明らかになった(図12)。この結果より、Gd-DTPA内包ミセル

は、DACHPt/Gd-DTPA内包ミセルよりも毒性が低く、投与量をもとめることが可能となった (data not shown)。最後に、Gd-DTPA内包ミセルの体内動態評価と固形がんモデルのMRイメージングを行った (図13)。その結果、Gd-DTPAがリリースされるために、Gdの血中濃度はPtのそれより低くなるものの、Gd-DTPA単独よりは高い血中滞留性を示し、結果的に固形がんにも効果的かつ選択的に集積することが示された。この結果は、10時間で約80%のGD-DTPAをリリースするというGd-DTPA内包ミセルの特性が、EPR効果によって固形がんへのGd-DTPAの集積を高めつつ、糸球体ろ過によってGd-DTPAを体外に排泄させるために理想的なものであることを示唆しているものと考えられる。この特性によって、Gd-DTPA内包ミセルは、腫瘍特異的にMRIの信号強度が増大させることが明らかになった。以上の結果より、Gd-DTPA内包ミセルは、Gd-DTPAのがん集積性を高める一方で、ミセルからGd-DTPAをリリースすることによって蓄積毒性を示さないシステムとなることが明らかになった。本システムは、がんの精密診断用ナノデバイスとしての利用が期待される。

E. 結論

本研究課題では、研究期間の前半において、Gd-DTPAを搭載し、DachPtによる治療効果をMRIによって追跡できる診断-治療機能一体型DDSの開発を行い、Theranostic Nanodeviceのコンセプトを実証することができた。本システムを利用すれば、DDSのがんへの集積と治療効果をMRIによってリアルタイムで観察することができるため、DDSによるがん治療の確実性を高めることができるものと考えられる。一方、研究期間の後半において、固形がんの精密診断を目的として、制がん活性を持たないGd-DTPA内包ミセルを開発し、MRI診断用ナノデバイスとしての有用性を明らかにした。本システムは、Gd-DTPAの蓄積毒性を示さないがんの精密診断用ナノデバイスとしての利用が期待される。

F. 健康危険情報

本研究課題は健康に危険を及ぼす可能性はない

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Md. Rafi, H. Cabral, M.R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhus gastric tumors and their lymph node metastasis. *J. Control. Release*, in press.
- 2) K. Miyazaki, Y. Morimoto*, N. Nishiyama, Y. Maekawa, W.-Z. Hu, K. Nakatate, K. Kaneda, N. Shinomiya, K. Kataoka, A novel homogeneous

irradiation fiber probe for whole bladder wall photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, in press.

- 3) K. Sakai-Kato*, K. Ishikura, Y. Oshima, M. Tada, T. Suzuki, A. Ishii-Watabe, T. Yamaguchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Kawanishi, H. Okuda, Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers. *Int. J. Pharm.* 423 (2) 401-409 (2012)
- 4) K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem. Soc. Rev.* 41 (7) 2562-2574 (2012)
- 5) M. Baba, Y. Matsumoto, A. Kashio, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Yamasoba*, Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J. Control. Release* 157 (1) 112-117 (2012)
- 6) T. Suma, K. Miyata, T. Ishii, S. Uchida, H. Uchida, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 33 (9) 2770-2779 (2012)
- 7) A. Iriyama*, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Y. Tamaki, Y. Yanagi, Gene transfer using micellar nanovectors inhibits choroidal neovascularization in vivo. *PLoS One* 6(12) e28560 (2011)
- 8) A. Iriyama*, T. Usui, Y. Yanagi, S. Amano, M. Oba, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Gene transfer using micellar nanovectors inhibits corneal neovascularization in vivo. *Cornea* 30 (12) 1423-1427 (2011)
- 9) H.-J. Kim, M. Oba, F. Pittella, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka*, PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J. Drug Target.* 20 (1) 33-42 (2011)
- 10) H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotech.* 6 (12) 815-823 (2011)
- 11) F. M. Mickler, Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, C. Brachle, N. Ruthardt*, Effect of integrin targeting and PEG shielding on polyplex micelle internalization studied by live-cell imaging. *J. Control. Release* 156 (3) 364-373 (2011)
- 12) H.-L. Lu, W.-J. Syu, N. Nishiyama, K. Kataoka, P.-S. Lai*, Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcome the drug-resistance in vivo. *J. Control. Release* 155 (3) 458-464 (2011)
- 13) H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Supramolecular nanodevices: From design validation to theranostic nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* 44 (10) 999-1008 (2011)

- 14) S. Herlambang, M. Kumagai, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, T. Nomoto, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J. Control. Release* 155 (3) 449-457 (2011).
- 15) H. Uchida, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, T. Suma, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of N-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (39) 15524-15532 (2011)
- 16) R. J. Christie, K. Miyata, Y. Matsumoto, T. Nomoto, D. Menasco, T. -C. Lai, M. Pennisi, K. Osada, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka*, Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer Comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* 12 (9) 3174-3185 (2011)
- 17) T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, S. Fukushima, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka*, In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *J. Control. Release* 151 (2) 104-109 (2011)
- 18) F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
- 19) Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka*, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* 149 (1) 51-57 (2011)
- 20) M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
- 21) M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka*, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
- 22) Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka*, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)
- 23) S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka*, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)
- 24) M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)
- 25) H. Takemoto, A. Ishii, K. Miyata, M. Nakanishi, M. Oba, T. Ishii, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, K. Kataoka*, siRNA-grafted polymer for polyion complex (PIC)-based siRNA delivery: Enhancement of PIC stability and gene silencing efficiency. *Biomaterials* 31 (31) 8097-8105 (2010)
- 26) H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. *J. Control. Release* 145 (2) 141-148 (2010)
- 27) K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials*, 31 (17) 4764-4770 (2010)
- 28) M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka*, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.* 7 (2) 501-509 (2010)
- 29) H. Shimizu, Y. Hori, S. Kaname, K. Yamada, N. Nishiyama, S. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, A. Yamada, K. Kataoka, T. Fujita*, siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (4) 622-633 (2010)
- 30) Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka*, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (14) 2552-2555 (2010)
- 31) K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials* 31 (17) 4764-4770 (2009)
- 32) M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka*, Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles combined with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release* 140 (3) 306-311 (2009)
- 33) M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M.R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka*, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.* 17 (8) 1404-1410 (2009)
- 34) M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y.

- Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka*, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol. Ther.* 17 (7) 1180-1186 (2009)
- 35) M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka*, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* 21 (34) 3520-3525 (2009)
- 36) Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka*, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009)
- 37) N. Nishiyama, Y. Morimoto, W.-D. Jang, K. Kataoka*, Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (4) 327-338 (2009)
- 38) W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, K. Kataoka*, Improving multipotent differentiation efficiency of mesenchymal stem cells using 3D spheroids method on micropatterned substrates. *Biomaterials* 30 (14) 2705-2715 (2009)
- 39) S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka*, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules* 10 (1) 119-127 (2009)
- 40) N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka*, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release* 133 (3) 245-251 (2009)
2. 学会発表
(国内学会)
- 1) 西山伸宏, "ナノスケールのトロイの木馬として機能する高分子ミセルによる薬剤耐性の克服/ Polymeric micelles as a nano-scaled Trojan horse to overcome drug resistance", 第13回図書館総合展フォーラム, パシフィコ横浜, 神奈川県 2011年11月10日(基調講演)
- 2) 西山伸宏, "Development of polymeric micelles for innovative cancer diagnosis and treatment", 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 愛知 2011年10月3日(依頼講演)
- 3) 西山伸宏, "光を利用したドラッグデリバリーシステムの設計", バイオメディカル・フォトニクス応用技術調査専門委員会 研究会, 東北大学 東京分室, 東京 2011年9月26日(依頼講演)
- 4) 西山伸宏, "高分子集合体を利用したターゲティング型 DDS の開発", 第24回インターフェックスジャパン, 東京ビッグサイト, 東京 2011年6月30日(招待講演)
- 5) 西山伸宏, "DDS が拓く未来医療", 第4回フロンティアサロン, 交詢社倶楽部, 東京 2011年1月14日(招待講演)
- 6) 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 呉寿栄, 松本有, 片岡一則, "オキサリプラチン耐性克服のための細胞内環境応答型高分子ミセルの開発", 第32回日本バイオマテリアル学会, グランドプリンスホテル広島, 広島 2010年11月30日(口頭)
- 7) 西山伸宏, "ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", バイオメディカルカリキュラム講義, 東京女子医科大学, 東京 2010年11月20日(特別講義)
- 8) 西山伸宏, 守本祐司, 片岡一則, "高分子ミセル型 DDS と光照射システムの融合による革新的 PDT", 第31回日本レーザー医学会総会, ウィンクあいち, 名古屋 2010年11月13日(招待講演)
- 9) 西山伸宏, "難治がん治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 第29回分子病理学研究会, 筑波大学 総合研究棟 D 棟, 茨城 2010年7月31日-8月1日(招待講演)
- 10) 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, "高分子ミセルを利用した細胞内薬物分布の時空間制御に基づく耐性がんの克服", 第26回日本 DDS 学会, 大阪国際交流センター, 大阪 2010年6月18日(口頭)
- 11) 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, "細胞内環境に応答する白金錯体制がん剤内包高分子ミセルの創製", 第59回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 横浜 2010年5月27日(口頭)
- 12) 西山伸宏, "ナノテクノロジーに基づく DDS 設計", 東京大学 GCOE プログラム 学融合に基づく医療システムイノベーション ナノバイオ工学, 東京大学工学部 4号館 43号会議室, 東京 2010年6月13日(セミナー)
- 13) 西山伸宏, "ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", バイオメディカルカリキュラム講義, 東京女子医科大学, 東京 2010年4月3日(特別講義)
- 14) 西山伸宏, "光線力学治療のための光増感剤内包高分子ミセルの開発", 日本薬学会第130年会 シンポジウム「異分野技術の融合による次世代の医療基盤技術の構築に向けて」, ホテルグランヴィア, 岡山 2010年3月19日(招待講演)
- 15) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーに基づくがん診断・治療システムの開発", 第6回ナノバイオ国際シンポジウム, 東京ビッグサイト, 東京 2010年2月17日(招待講演)
- 16) 西山伸宏, "高分子集合体を基盤とした診断-治療一体型 DDS", 第3回 NEDO 特別講座シンポジウム「次世代 DDS が切り拓く未来医療」,

東京女子医科大学 弥生講堂, 東京 2009 年 12 月 12 日(特別講義)

- 17) 西山伸宏, "高分子集合体を基盤とする生体ナノ環境可視化システム", 生体ナノ環境の時空間制御を目指して, 北海道大学大学院薬学研究院・臨床薬学講義室, 北海道 2010 年 1 月 5 日(招待講演)
- 18) 西山伸宏, 宮田完二郎, 位高啓史, 大庭誠, 石井武彦, 片岡一則 "高機能ポリマー材料を基盤とした遺伝子デリバリーシステムの設計" 第 18 回ポリマー材料フォーラム研究会, タワーホール船堀, 東京 2009 年 11 月 24 日(ポスター)
- 19) 西山伸宏, 片岡一則 "全身投与による遺伝子デリバリーのための高分子ナノキャリア設計", JST 新技術説明会, JST 東京本部, 東京 2009 年 11 月 20 日(依頼講演)
- 20) 西山伸宏, "環境応答性キャリアの設計・光応答性キャリアの設計", NEDO 講座「刺激応答システム」講座, 東京女子医科大学, 東京 2009 年 11 月 5 日(特別講義)
- 21) 西山伸宏 "ナノテクノロジーが拓く未来医療", 現代科学セミナー, 東京理科大学長万部キャンパス, 北海道 2009 年 10 月 30 日(招待講演)
- 22) 西山伸宏 "Development of polymeric micelles for innovative cancer therapy", 第 68 回 日本癌学会シンポジウム「ナノテクノロジーがもたらす新規がん治療」, パシフィコ横浜, 神奈川 2009 年 10 月 2 日(招待講演)
- 23) 西山伸宏, 韓ムリ, 大庭誠, カブラル・オラシオ, 狩野光伸, 片岡一則 "がん深部への遺伝子・薬剤デリバリーのためのナノキャリアの設計", 第 58 回高分子討論会, 熊本大学 黒髪キャンパス, 熊本 2009 年 9 月 17 日(口頭)
- 24) 西山伸宏, "高分子ミセル型医薬品の開発", 技術情報協会セミナー 難治性がん治療薬開発に向けた治療の現状・DDS 技術・マーカー開発, 大井町きゅりあん, 東京 2009 年 7 月 31 日(招待講演)
- 25) 西山伸宏, "ナノ技術を利用した DDS", 第 2 回富山ライフサイエンスシンポジウム, 高志会館「カルチャーホール」, 富山 2009 年 7 月 25 日(招待講演)
- 26) 西山伸宏, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 宮崎幸造, 浦野京子, 守本祐司, 張祐銅, 片岡一則, "微小がんの光線力学治療のための診断-治療機能一体型高分子ミセルの開発", 第 58 回高分子学会年次会, 神戸国際会議場・神戸国際展示場, 神戸 2009 年 5 月 27-29 日
- 27) 西山伸宏, 片岡一則 "がん標的治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 岡山肝癌研究会, 岡山コンベンションセンター, 岡山 2009 年 4 月 25 日(特別講演)
- 28) 西山伸宏, "高分子ミセルを利用した診断・治療システムの開発", 第 48 回日本生体医工学会

大会 オーガナイズドセッション「ナノキャリアーと物理エネルギーを融合したハイブリット標的化診断・治療」, タワーホール船堀, 東京 2009 年 4 月 25 日(シンポジスト)

(国際学会)

- 1) N. Nishiyama, "Development of functional polymeric micelles for cancer diagnosis and therapy", The 14th Asian Chemical Congress (14-ACC), Bangkok, Thailand, September 5-8, 2011 (Invited Lecture)
- 2) N. Nishiyama, "Development of functional polymeric micelles for cancer diagnosis and therapy", Singapore-Japan "Bioelectronics" Workshop (August 11-12), Keihanna plaza, Kyoto, Japan, August 12, 2011 (Invited Lecture)
- 3) N. Nishiyama, "Development of photosensitizer drug delivery system for cancer theranostics", 28th International Conference of Photopolymer Science and Technology (June 21-24, 2011), University Convention Hall, Chiba University, Chiba, Japan, June 24, 2011 (Invited Lecture)
- 4) N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of smart nanocarriers for photosensitizer delivery", 13th World Congress of International Photodynamic Association (IPA) (May 10-14, 2011), Innsbruck, Austria, May 12, 2011 (Invited Lecture)
- 5) N. Nishiyama, "Development of functional polymeric micelles for cancer diagnosis and therapy", 2011 International Symposium on Intelligent Drug Delivery Systems (April 28-29, 2011), KIST, Seoul, Korea, April 28, 2011 (Invited Lecture)
- 6) N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Polymeric micelles for photodynamic diagnosis and therapy", The 15th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Sheraton Hotel, Salt Lake City, Utah, USA, February 13-16, 2011 (Oral)
- 7) N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Nanocarrier-mediated photodynamic diagnosis and therapy of malignant tumors", 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology (October 5-7, 2010) "New Directions In Nanotheranostics: Imaging, Biosensors, Materials and DNA Technologies", Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany, October 6, 2010 (Invited Lecture)
- 8) N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, "Development of smart polymeric micelles for innovative cancer therapy", World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, September 1, 2010 (Invited Lecture)
- 9) N. Nishiyama, "Block copolymer micelles as smart supramolecular nanodevices for tumor targeting", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 19, 2009 (Invited Lecture)
- 10) N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, W.-D.

Jang, K. Kataoka, "Development of dendrimer phthalocyanine-loaded polymeric micelles for diagnosis and treatment of microcarcinoma", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 22, 2009 (Oral)

- 11) N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, W. - D. Jang, K. Kataoka, "Development of Dendrimer Phthalocyanine-Loaded Polymeric Micelle for Detection and Treatment of Microcarcinoma", 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers (FBPS2009), TORAY Human Resources Development Center, Mishima, Japan, May 20, 2009 (Poster)

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 西山伸宏, 他6名, MRI造影剤用高分子ミセル複合体, 出願人：国立大学法人東京大学, 出願日：平成21年7月21日, 出願番号：特願2009-169671 / PCT/JP2010/062264
- 2) 西山伸宏, 他3名, 抗腫瘍性組成物および腫瘍の治療方法, 出願人：国立大学法人東京大学, 出願日：平成22年7月15日, 出願番号：PCT/JP2010/061958
- 3) 西山伸宏, 他3名, 発明の名称：シスプラチン配位化合物の液体組成物, 出願人：国立大学法人東京大学, ナノキャリア株式会社, 出願日：平成23年8月30日, 出願番号：11109137.2

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Rafi, N. Nishiyama, et al.	Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis	J. Control. Release		印刷中	2012
M.Baba, N. Nishiyama, et al.	Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs	Mol. Pharm.	157	112-117	2012
H. Cabral, N. Nishiyama, et al.	Supramolecular nanodevices: From design validation to theranostic nanomedicine	Acc. Chem. Res.	44	999-1008	2011
H. Cabral, N. Nishiyama, et al.	Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size	Nature Nanotech.	6	815-823	2011
T. Nomoto, N. Nishiyama, et al.	In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy	J. Control. Release	151	104-109	2011
M. Kumagai, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood	Macromol. Rapid Commun.	31	1521-1528	2010
S. Kaida, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model.	Cancer Res.	70	7031-7041	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography.	Biomed. Opt. Express	1	1209-1216	2010
M. Murakami, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting.	Science Transl. Med.	3	64ra2	2011
M. Kumagai, N. Nishiyama et al.	Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles	J. Control. Release	140	306-311	2009
N. Nishiyama, et al.	Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy.	Adv. Drug Deliv. Rev.,	61	327-338	2009
N. Nishiyama, et al.	Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer	J. Control. Release	133	245-251	2009
H. Cabral, N. Nishiyama, et al.	A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles.	Pharm. Res.	26	82-92	2009



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel

Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis

Md. Rafi^a, H. Cabral^b, M.R. Kano^{c,f}, P. Mi^b, C. Iwata^c, M. Yashiro^d, K. Hirakawa^d, K. Miyazono^{c,f}, N. Nishiyama^{a,f,*}, K. Kataoka^{a,b,e,f,**}

^a Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^b Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656, Japan

^c Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

^d Department of Surgical Oncology, Medical School, Osaka City University, Osaka, Japan

^e Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^f Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2011

Accepted 27 January 2012

Available online xxxx

Keywords:

Drug delivery

Chemotherapy

Polymeric micelles

Gastric cancer

Lymph node metastasis

ABSTRACT

Nano-scaled drug carriers have great potential for the treatment of solid tumors. Nevertheless, hypovascularity and fibrosis in some types of solid tumors have been demonstrated to reduce the penetration and accumulation of nano-scaled drug carriers. Diffuse-type scirrhous gastric cancers present such characteristics as well as frequent metastasis to the lymph nodes; therefore, it remains a great challenge to eradicate scirrhous gastric cancers based on the drug targeting using nanocarriers. Herein, we demonstrated that polymeric micelles with 30-nm diameter incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt), the parent complex of the anticancer drug oxaliplatin, efficiently penetrated and accumulated in an orthotopic scirrhous gastric cancer model, leading to the inhibition of the tumor growth. Moreover, the elevated localization of systemically injected DACHPt-loaded micelles in metastatic lymph nodes reduced the metastatic tumor growth. These results suggest DACHPt-loaded micelles as a promising nanocarrier for the treatment of scirrhous gastric cancers and their lymphatic metastases.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nano-scaled drug carriers are being developed for improving the treatment of solid tumors while decreasing the toxicity [1–5]. These nanocarriers effectively accumulate in solid tumors due to the hyperpermeability of blood capillaries to circulating macromolecules and the impaired lymphatic drainage of these macromolecules, which are known as the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect [6]. Indeed, several nanocarrier formulations have been approved for clinical use against hypervascular cancers such as ovarian cancers, HIV-associated Kaposi's sarcoma and breast cancers [7,8]. However, in some intractable cancers such as pancreatic and gastric cancers, the hypovascularity and fibrosis of tumors may compromise the extravasation and tissue penetration of nanocarriers [9,10].

Gastric cancers cause 1 million deaths per year worldwide being the 2nd leading cause of cancer-related death following lung cancer [11]. Among gastric cancers, a diffuse-type scirrhous gastric cancer (SGC) affects younger patients and presents the highest mortality [12]. SGC is characterized by hypovascularity, extensive stromal fibrosis and metastasis to the lymph nodes [13–15]. These characteristics impair the therapeutic efficacy of chemotherapy as well as nanocarrier-mediated targeting chemotherapy. Moreover, the targeting chemotherapy against lymph node metastasis involve intralymphatic or local administration of nanocarrier-encapsulated antitumor agents [16–18]; however, these approaches may not target all draining lymph nodes due to the inappropriate position of the injection [18] and the obstruction of lymphatic vessels in advanced stages of cancer [18–19]. Hence, the improved targeting against the lymph node metastasis is strongly needed to eradicate the lymph node metastasis.

Polymeric micelles, self-assemblies of block copolymers are characterized by the core-shell structures with drug-loaded core surrounded by hydrophilic PEG shell, and have shown great potential as tumor-targetable nanocarriers [3–5]. The substantial advantages of polymeric micelles include relatively small size ranging from 20 to 100 nm, controllable drug loading and release, and favorable bio-distribution including prolonged blood circulation and enhanced tumor accumulation [3–5]. Accordingly, micelle formulations

* Correspondence to: N. Nishiyama, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Tel.: +81 3 5841 1430; fax: +81 3 5841 1419.

** Correspondence to: K. Kataoka, Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan. Tel.: +81 3 5841 7138; fax: +81 3 5841 7139.

E-mail addresses: nishiyama@bmw.t.u-tokyo.ac.jp (N. Nishiyama), kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp (K. Kataoka).

incorporating doxorubicin, SN-38, paclitaxel, cisplatin, and (1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) (an active form of oxaliplatin) exerted significant efficacy against several tumor models with appreciably lowered toxicity compared to free drugs, and are currently under clinical evaluation [20–24]. Particularly, DACHPt-loaded polymeric micelles (DACHPt/m) are characterized by the small size (ca. 30 nm) [25–26], achieving high penetration into tumor mass and remarkable antitumor activity against poorly permeable tumors such as pancreatic tumors [27–29].

This study was aimed to evaluate the targeting ability and therapeutic efficiency of systemically injected DACHPt/m against a well-established experimental model of SGC, which was prepared by orthotopic inoculation of OCUM-2MLN scirrhous gastric cancer cells [30–31]. In the orthotopic SGC model of OCUM-2MLN cells, the induction of lymph node metastasis occurs in all mice, while the tumor microenvironment shows hypovascularity and thick fibrosis similar to SGC in the patients, indicating the clinical relevancy of this model [30–31]. Here, the therapeutic potential of the DACHPt/m against orthotopic SGC and their lymph node metastasis was examined by using bioluminescent OCUM-2MLN-Luc tumors.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bis(trichloromethyl)carbonate (triphosgene) was purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Inc. (Tokyo, Japan). γ -Benzyl L-glutamate was purchased from Sigma Chemical Co., Inc. (St. Louis, MO). *N,N*-Dimethylformamide (DMF) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Wako Pure Chemical Co., Inc. (Osaka, Japan). Dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPtCl₂) was purchased from Heraeus (Germany). AgNO₃ was purchased from Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, WI). α -Methoxy- ω -amino poly(ethylene glycol) (CH₃O-PEG-NH₂; Mw = 12,000) was purchased from NOF Co., Inc. (Tokyo, Japan). Alexa 594- and Alexa 680-*N*-hydroxysuccinimide ester were purchased from Invitrogen (USA).

2.2. Animals and cells

Immunodeficient BALB/c nu/nu mice at 6 weeks of age were obtained from Charles River Laboratories (Tokyo, Japan), and treated in accordance with the policies of the Animal Ethics Committee of The University of Tokyo. Human diffuse-type gastric carcinoma OCUM-2MLN cells were used for the model of diffuse-type scirrhous gastric cancer (SGC) with high frequency of the lymph node metastasis [30–31]. OCUM-2MLN cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Sigma Chemicals) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. Preparation of PEG-*b*-P(Glu)

Poly(ethylene glycol)-poly(L-glutamic acid) block copolymers (PEG-*b*-P(Glu)) were synthesized according to the previously described synthetic method with a slight modification [25]. Briefly, *N*-carboxy anhydride of γ -benzyl L-glutamate was polymerized in DMF, initiated by the primary amino group of CH₃O-PEG-NH₂ to obtain PEG-poly(γ -benzyl-L-glutamate) block copolymer (PEG-*b*-PBLG). A narrow distribution (Mw/Mn: 1.06) of PEG-*b*-PBLG was confirmed by gel permeation chromatography [column: TSK-gel G3000HHR, G4000HHR (Tosoh, Yamaguchi, Japan); eluent: DMF containing 10 mM LiCl; flow rate: 0.8 ml/min; detector: refractive index (RI); temperature: 25 °C]. The polymerization degree of PBLG was determined to be 20 by comparing the proton ratios of methylene units in PEG (—OCH₂CH₂—; δ = 3.7 ppm) and phenyl groups of PBLG (—CH₂C₆H₅—; δ = 7.3 ppm)

in ¹H-NMR measurement [JEOL EX270 (JEOL, Tokyo, Japan); solvent: DMSO-*d*₆; temperature: 80 °C]. The deprotection of the benzyl group of PEG-*b*-PBLG was carried out by mixing with 0.5 N NaOH at room temperature to obtain PEG-*b*-P(Glu).

PEG-*b*-P(Glu) was fluorescently labeled by the conjugation of Alexa 594- or Alexa 680-succinimidyl esters to the ω -amino group of the polymer in DMSO. Twenty-four hours later, the polymers were purified by dialysis against DMSO followed by water. Finally, the solutions were freeze-dried, and the amount of conjugated dye was determined to be approximately 70% (% fluorescent dye / PEG-*b*-P(Glu)) by fluorescence spectroscopy.

2.4. Preparation of DACHPt-loaded micelles (DACHPt/m)

DACHPt/m were prepared according to a previously described method [25]. Briefly, DACHPtCl₂ (5 mM) was suspended in distilled water and mixed with silver nitrate [(AgNO₃)/(DACHPt) = 1] to form DACHPtCl(NO₃). The solution was kept in the dark for 24 h at 25 °C. AgCl precipitate after reaction was eliminated by centrifugation. The supernatant was purified by passage through a 0.22 μ m filter. Then, PEG-*b*-P(Glu) [(Glu) = 5 mmol/l] was added to the DACHPt solution [(DACHPt)/(Glu) = 1.0] and reacted for 120 h to prepare DACHPt/m. The prepared micelles were purified by ultrafiltration [molecular weight cutoff size (MWCO): 30,000]. The size distribution of DACHPt/m was evaluated by dynamic light scattering (DLS) measurement at 25 °C, using the Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom).

The Pt content of the micelles was determined by using an ion coupled plasma-mass spectrometer (4500 ICP-MS; Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Fluorescently labeled DACHPt/m were prepared in a similar manner with Alexa 594- or Alexa 680-labeled PEG-*b*-P(Glu).

2.4.1. *In vitro* cytotoxicity assay

To determine the cytotoxicity, OCUM-2MLN cells were seeded in a 96 well plate and incubated at 37 °C. Then, the cells were exposed to free oxaliplatin or DACHPt/m for 48 or 72 h, followed by the addition of MTT solution. Cell viability was measured by the formed formazan absorbance at 570 nm.

2.5. Preparation of orthotopic SGC models with lymphatic metastasis

Lentiviral vector [32] was used to express the luciferase protein gene stably in OCUM-2MLN cells. The prepared OCUM-2MLN-Luc cells were grown in DMEM containing 10% FBS. For preparation of orthotopic SGC models, OCUM-2MLN-Luc cells were inoculated by orthotopic implantation method. Briefly, after the abdomen of BALB/c nu/nu mice was sterilized with alcohol, an incision was made to expose the stomach, and OCUM-2MLN-Luc cell suspension was injected sub-serosally into the gastric walls as previously described [33]. The stomach was then returned into the peritoneal cavity, and the abdominal wall and the skin were closed with surgical suture.

2.6. Evaluation of antitumor activity by bioluminescent imaging

Bioluminescent imaging [34] was carried out with a highly sensitive CCD camera using IVIS imaging system (IVIS, Caliper Life Science, Hopkinton, MA). Imaging and quantification of signals were analyzed by Living Image software (Caliper Life Science). For *in vitro* imaging, bioluminescent cells were diluted in cell culture media in a black, 96-well plate (Costar, Corning, NY). VivoGlo luciferin (Promega, Madison, WI) at 150 μ g/ml in media was added to each well 5 min prior to imaging. Imaging was performed for 1 min per plate. For the analysis of antitumor activity, BALB/c nu/nu (*n* = 5) mice were inoculated by orthotopic injection of OCUM-2MLN-Luc cells (5 \times 10⁶). Tumors were allowed to grow for 3 weeks, to initiate the metastasis to the lymph nodes. Subsequently, the mice received three *i.v.* injections of oxaliplatin (8 mg/kg)

and DACHPt/m (4 mg/kg on a Pt base) on days 0, 2 and 4. Photon flux was measured until 2 weeks and was taken as a parameter of tumor volume. Body weight was measured simultaneously to assess the toxicity.

2.7. Antitumor activity against lymph node metastasis

To study the antitumor efficacy of the DACHPt/m against lymphatic metastasis, the mice were sacrificed at the end of the antitumor activity experiment and the metastatic lymph nodes were excised and weighed. The inhibition of the growth of the metastases was associated with the weight of the lymph nodes.

2.8. Accumulation of DACHPt/m in orthotopic tumors and metastatic lymph nodes

In order to analyze the biodistribution of oxaliplatin and DACHPt/m, OCUM-2MLN-Luc cells (5×10^6 cells/ml) were injected sub-serosally into the gastric walls of BALB/c nu/nu mice (female, $n = 5$). Four weeks later, oxaliplatin and DACHPt/m were intravenously injected at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ on a platinum basis. Mice were sacrificed after defined time periods (1, 4 and 24 h), and then tumor and metastatic lymph nodes were collected. Tissue samples were washed in ice-cold saline and weighed after removing excess fluid. All samples were dissolved in HNO_3 and evaporated to dryness. The Pt concentration was measured by ICP-MS after the samples were redissolved in 5N HCl.

2.9. Biodistribution of fluorescent-labeled DACHPt/m

DACHPt/m were labeled with Alexa 680 to investigate the accumulation in orthotopic gastric tumors and metastatic lymph nodes. OCUM-2MLN (5×10^6 cells/ml) cells were inoculated sub-serosally into the gastric walls of BALB/c nu/nu mice and the tumors were allowed to grow for about 3 weeks. Alexa 680-labeled DACHPt/m (5 mg/kg on Pt basis) were intravenously injected and the mice were imaged after 24 h to track the accumulation of micelles in the

whole body by using IVIS imaging system (excitation: 640 nm; emission: 720 nm; exposure time: 1 s; field of view: 18.1 cm). Then, the mice were sacrificed and the organs (liver, kidney and spleen), the primary tumor and the metastatic lymph nodes were imaged *ex vivo* to evaluate the accumulation of micelles.

2.10. Microdistribution of fluorescent micelles in orthotopic tumor and lymph node metastasis

Tumor bearing mice were injected intravenously with Alexa 594-labeled DACHPt/m to evaluate their microdistribution in primary tumors and metastatic lymph nodes by histology. Tumors, metastatic and normal lymph nodes were excised, snapped frozen in liquid nitrogen and embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek). The frozen samples were sectioned at 10- μm thickness in a cryostat and fixed with 10% formalin. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and observed using an Olympus AX80 microscope (Olympus, Japan). For immunohistochemical analysis, the tissue sections were also stained for lymphatic vessels by using anti-LYVE-1 antibody (Abcam), blood vessels by using anti-PECAM-1 antibody (BD PharMingen), and cancer cells by using anti-CD326 antibody (EpCAM, Miltenyi biotec), followed by staining with Alexa488- and Alexa647-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). Hoechst 33342 was used for nuclear staining. The stained tissue samples were observed using a LSM510 META laser confocal microscope (Carl Zeiss, Germany).

3. Results

3.1. In vitro characterization of DACHPt-loaded micelles (DACHPt/m)

The polymer-metal complex formation between DACHPt and the carboxylic group of the P(Glu) in the PEG-*b*-P(Glu) led to the formation of polymeric micelles with an average diameters of approximately 30-nm (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1A). DACHPt/m can release cytotoxic DACHPt complexes from the micelle core by the ligand

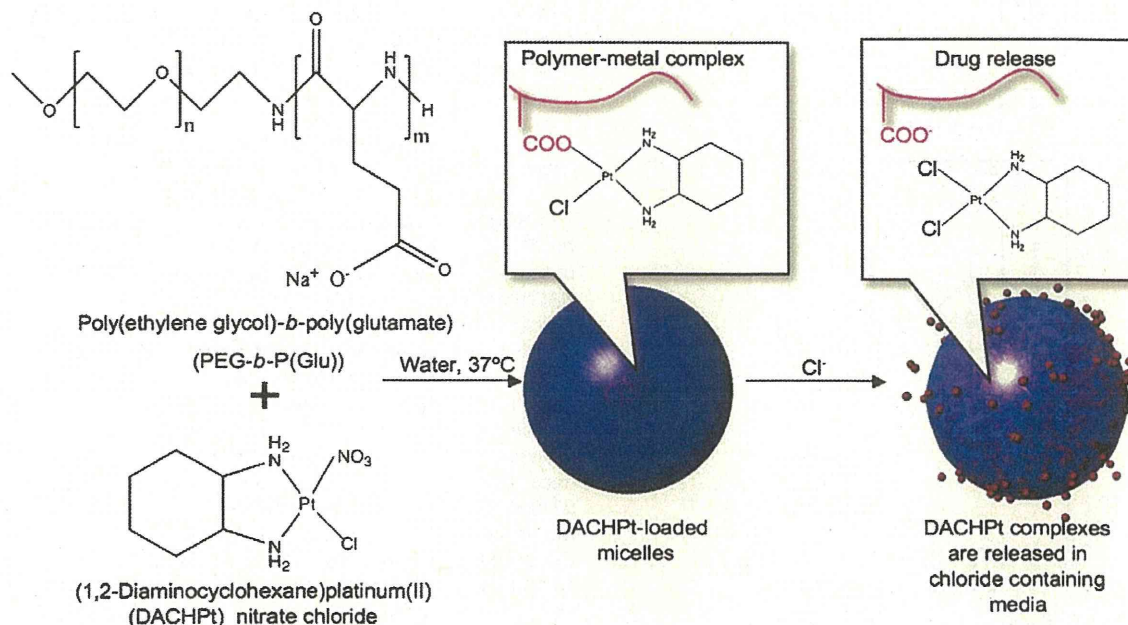


Fig. 1. Scheme of the preparation of DACHPt-loaded micelles (DACHPt/m). The micelles are formed by the polymer-metal complex formation between DACHPt and the carboxylic acid moieties in the poly(glutamic acid) backbone. DACHPt is released in a sustained manner as a result of the ligand substitution of the Pt(II) from the carboxylates in the core of the micelles with the chloride ions in the medium.

Table 1

Fifty-percent cell growth inhibitory concentration (IC_{50}) of DACHPt/m and oxaliplatin against human scirrhous gastric cancer OCUM-2-MLN cells.

Drug	IC_{50} (μ M)	
	48 h	72 h
DACHPt/m	20.0	12.5
Oxaliplatin	12.5	6.25

exchange of DACHPt from the carboxylic groups of p(Glu) to the chloride ions in the media [28]. The 50% cell growth inhibitory concentration (IC_{50}) of DACHPt/m was approximately 2-fold higher than that of oxaliplatin (Table 1).

3.2. Antitumor activity against bioluminescent orthotopic gastric tumors

OCUM-2MLN cells stably expressing luciferase gene (OCUM-2MLN-Luc) were prepared by the lentiviral transfection. The bioluminescent signal of OCUM-2MLN-Luc after the addition of luciferin was measured by IVIS (Supplementary Fig. S2). As the light glowing from the cells increased linearly with cell density (Supplementary Fig. S2), we can use the light intensity of OCUM-2MLN-Luc to quantify the tumor burden.

The antitumor activity of oxaliplatin and DACHPt/m was studied in mice bearing orthotopic OCUM-2MLN-Luc tumors that have

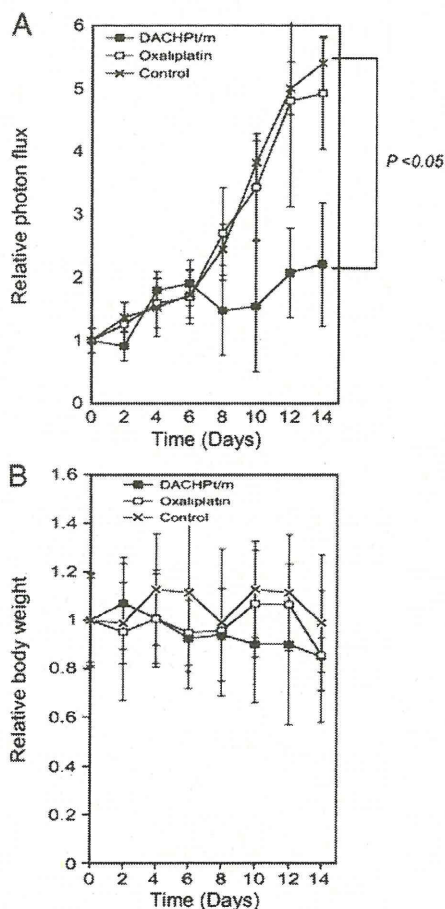


Fig. 2. Antitumor activity of oxaliplatin and DACHPt/m against bioluminescent OCUM-2-MLN-Luc orthotopic gastric cancer. A, Relative photon flux from the tumors after the injection of saline, oxaliplatin 8 mg/kg and DACHPt/m 4 mg/kg on days 0, 2 and 4. B, Relative body weight of the mice. Data are expressed as a mean \pm SE ($n = 5$).

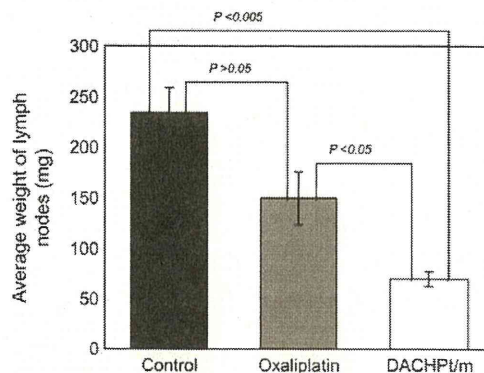


Fig. 3. Weight of the metastatic lymph nodes at the end of the antitumor activity experiment (day 14). Data are expressed as a mean \pm SE ($n = 5$).

already developed metastasis to the lymph nodes. The mice were treated intravenously 3 times at 0, 2 and 4 days with oxaliplatin at 8 mg/kg or DACHPt/m at 4 mg/kg on a Pt basis. The photon flux (photons per second) from the bioluminescent tumors was assessed by IVIS every second day. Consequently, oxaliplatin failed to show any antitumor effect against the OCUM-2MLN-Luc tumors as the photon flux of oxaliplatin-treated mice was comparable to that of untreated mice (Fig. 2A). In contrast, the mice treated with DACHPt/m showed significantly lower relative photon flux compared with untreated and oxaliplatin-treated mice (Fig. 2A) without significant body weight loss (Fig. 2B), indicating a significant antitumor activity against the orthotopic gastric tumors.

3.3. Growth inhibition of lymph node metastasis

At the end of the antitumor activity study, the mice were sacrificed and the metastatic lymph nodes were collected and weighed. As shown in Fig. 3, the weights of the lymph nodes in DACHPt/m-treated mice were approximately four and two times lower than those in untreated mice and oxaliplatin-treated mice, respectively, suggesting that DACHPt/m might effectively inhibit the growth of the metastatic lymph nodes and their efficacy might surpass that of oxaliplatin.

3.4. Biodistribution of DACHPt/m in orthotopic gastric tumors and metastatic lymph nodes

DACHPt/m gradually accumulated in the orthotopic tumors due to the EPR effect, achieving approximately 10% of injected dose per gram of tumor tissue at 24 h (Fig. 4A). The tumor accumulation at 24 h for DACHPt/m was 6 times higher than oxaliplatin (Fig. 4A). DACHPt/m also showed enhanced accumulation in sentinel and distant metastatic lymph nodes (Fig. 4B and C). The effective accumulation of DACHPt/m in the metastatic lymph nodes may account for their effective growth inhibition of lymphatic metastasis.

The *in vivo* distribution of fluorescent-labeled DACHPt/m was assessed by fluorescent imaging of the whole body of tumor-bearing mice. Twenty-four hours after intravenous injection of fluorescent-labeled DACHPt/m, intense fluorescence signal was detected at the tumor site, suggesting the selective accumulation of DACHPt/m in the orthotopic tumors (Fig. 5A). In addition, mice were sacrificed and the tumor, metastatic lymph nodes and organs (i.e., spleen, liver and kidneys) were imaged *ex vivo* (Fig. 5B). The high fluorescence signal of the micelles in the tumor and metastatic lymph nodes indicates the ability of the micelles to target the scirrhous gastric tumors and their lymphatic metastases.